



Invasion fulgurante de la pyrale du buis en Europe :
Caractérisation de la diversité génétique de *Cydalima perspectalis*
(Walker, 1859) et approche phylogéographique.

Audrey Bras

INRA d'Orléans, Unité de Zoologie Forestière,
2163 avenue de la pomme de pin, CS40001 Ardon, 45075 ORLEANS CEDEX 2

**Sous l'encadrement de
Marie-Anne Auger-Rozenberg**

Résumé :

Ces dernières années, le développement du commerce horticole en lien avec la mondialisation a permis l'introduction en Europe d'insectes invasifs dont la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* qui se développe au détriment du buis commun utilisé en ornement et a été observée pour la première fois en Allemagne en 2007. L'introduction de cet insecte serait due au commerce de plantes d'ornements entre les pays européens et la Chine tandis que le commerce au sein de l'Europe aurait facilité sa dispersion. Pour mieux comprendre les voies d'invasions, la Chine, la Corée et 12 des 24 pays européens attaqués par *C. perspectalis* ont été échantillonnés puis analysés avec un marqueur mitochondrial pour décrire la diversité génétique et obtenir un premier aperçu de sa phylogéographie. Nous avons trouvé 7 haplotypes en Asie répartis dans 3 haplogroupes. En Europe, 4 de ces haplotypes ont été observés. Les premiers résultats ont montré une absence de structure dans la zone d'origine ne permettant pas de définir des zones sources potentielles. Cependant, la présence d'une diversité génétique importante en Europe liée à une structuration géographique faible mais significative, sont en faveur d'introductions multiples. Au vu des résultats obtenus, des scénarios ont été proposés pour expliquer l'introduction depuis l'Asie et la propagation fulgurante en Europe.

Mots Clés : Insecte Invasif, Commerce Ornamental, ADN mitochondrial, Asie, Introductions multiples

Abstract

In the last years, ornamental plant trade has enabled the introduction of numerous invasive insects in Europe as the box tree moth *Cydalima perspectalis* which attacks commonly planted ornamental box tree and was first detected in Germany in 2007. The trade between Europe and China could be the reason of the introduction of the insect in Europe while the trade in Europe should be aid the quick spread. In order to disentangle invasion pathways, samples of *C. perspectalis* have been collected in China, Korea and in 12 of the 24 invaded european countries. We analyzed sequences of mitochondrial marker COI to describe the genetic variation and to have a first approach of phylogeography. We founded 7 haplotypes in Asia within 3 haplogroups. Four of those haplotypes were observed in Europe. Our preliminary results have showed a lack of structure in the origin area that don't allow to define potential sources regions but the high genetic diversity of the box tree moth in Europe in addition with a low but significant geographical structure are in favor of multiple introductions. Scenarios have been proposed to explain the introduction from Asia and the fast dispersal of the insect in Europe.

Keywords : Invasive insect, Ornamental trade, mitochondrial DNA, Asia, multiple introductions

I. Introduction.

L'intensification des échanges à l'échelle de la planète, la rapidité des transports, l'essor du commerce des plantes ornementales et produits agricoles, le réchauffement climatique, sont autant de facteurs contribuant à l'introduction non intentionnelle et à la survie d'organismes (champignons, insectes...) dans de nouvelles zones géographiques éloignées de leur région d'origine. Bien qu'une faible partie des espèces introduites accidentellement deviennent invasives, cela entraîne des pertes financières très importantes dans le secteur agricole et forestier, et peut également conduire à des menaces pour la santé humaine (moustique tigre) et la biodiversité (frelon asiatique, capricornes asiatiques, ...) (Su 2013; Roques et al. 2015). Le niveau actuel des introductions et des invasions biologiques n'a jamais été observé auparavant, tant au niveau du rythme que de l'ampleur. Parmi ces invasifs, le nombre d'arthropodes terrestres introduits par an en Europe est en constante augmentation avec globalement un taux d'arrivée multiplié par deux en l'espace des trente dernières années, et dont la majorité des espèces répertoriées sont des insectes (Roques 2010). Au cours de la dernière décennie, près de 70% des introductions d'insectes d'importance agronomique sont imputables au secteur de l'horticulture ornementale, en particulier au commerce de plantes ligneuses (arbres ou arbustes) (Martinez et al. 2014). De ce fait, le commerce des plantes est un pourvoyeur majeur d'espèces exotiques envahissantes. Souvent, ces invasifs ne font pas de dégâts dans leur pays d'origine grâce à la présence d'ennemis naturels ou à la résistance de

leurs hôtes. Ils sont fréquemment introduits avec leur plante hôte, comme le cynips du châtaignier *Dryocosmus kuriphilus* (Avtzis & Matosevic 2013), le charançon du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* ou la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* (Bella 2013) ou bien se comportent en passagers clandestins sur différents types de supports, comme le capricorne asiatique *Anoplophora glabripennis* (Vaes-Petignat & Nentwig 2014) ou la punaise nord-américaine *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur et al. 2014). Une fois établis dans leurs nouveaux territoires, ces ravageurs peuvent se disperser naturellement de façon active mais également de façon opportuniste et passive *via* le transport de plants infestés, ce qui les rend quasiment impossible à éradiquer. La vitesse à laquelle ces espèces se propagent s'accroît également, et on observe de plus en plus fréquemment des phénomènes d'expansions fulgurantes dans les zones envahies, résultant d'introductions multiples en provenance directe des zones d'origine mais également à partir des premières populations pionnières.

Aujourd'hui les insectes invasifs proviennent en majorité d'Asie, devenu un nouveau leader dans le secteur horticole (Roques 2010; Martinez et al. 2014). Parmi les pays asiatiques, c'est la Chine qui est actuellement un des pays les plus producteurs de plantes d'ornements et exporte beaucoup vers l'Europe, à l'inverse du Japon et de la Corée peu présents sur le marché de l'ornement. A l'échelle de l'Europe, les Pays-Bas dominent le marché de plantes ornementales. Ce pays est un important producteur de plants d'ornements mais aussi un gros importateur notamment en provenance de l'Asie (Cadic & Widehem 2006). Avec l'ouverture de ces nouveaux marchés, l'Asie est devenue le point focal des transports et mouvements de marchandises. Les Pays-Bas, par exemple, redistribuent donc aussi bien des plants produits en interne que des plants importés de Chine vers les autres pays européens. Néanmoins des pays comme la France, la Belgique, l'Allemagne, l'Italie ou l'Espagne produisent eux-mêmes un certain nombre de plantes d'ornements sur leur territoire. Cependant, depuis une vingtaine d'années, les jardinerie non spécialisées et le commerce sur internet ont gagné des parts de marché sur la vente et le commerce de détail des plantes ornementales, et une grande partie des entreprises nationales ne sont pas dimensionnées pour faire face à cette demande de l'aval, ce qui explique l'augmentation du volume des importations depuis les pays européens comme les Pays-Bas. Ensuite, ces mêmes pays exportent aussi vers les pays de l'Europe Centrale comme la Hongrie ou l'Autriche et ceux entourant la Mer Noire comme la Russie (Gninenko et al. 2014). Ces ramifications multiples montrent la complexité des échanges mondiaux et intra-Europe et la difficulté d'obtenir des informations précises sur des statistiques commerciales, en particulier quand on cible une plante spécifique. Par exemple, les seules

informations publiées concernant le commerce de buis sont l'existence d'importations de plants depuis la Chine vers les Pays-Bas principalement et de manière moins importante vers l'Italie, bien que l'on soupçonne d'autres routes commerciales d'approvisionnement (EPPO 2012). De plus, quand les données historiques existent, elles peuvent parfois être source d'erreurs, comme ce fut le cas pour le ravageur des graines de cèdres *Megastigmus schimitscheki* introduit dans le sud-est de la France avec des graines supposées provenir de Turquie alors que l'insecte provient en fait de Chypre (Auger-Rozenberg et al. 2012). Et c'est bien souvent l'utilisation de l'outil génétique, associé aux données historiques et biologiques, qui permet de reconstituer les routes empruntées par les invasifs. Il est en effet possible, grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires, d'analyser la variabilité génétique au sein d'une espèce et de retracer sa phylogéographie, tant dans la zone d'origine que dans celle d'introduction. L'étude phylogéographique permet d'étudier les relations phylogénétiques entre populations d'une espèce en fonction de leur distribution géographique et de comprendre les processus à l'origine de la structuration des populations dans les différentes zones, pour proposer divers scénarios. Le gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase I est ainsi couramment utilisé pour comprendre les phénomènes d'introduction de nombreux insectes invasifs comme *M. schimitscheki*, *Cameraria ohridella* (Valade et al. 2009) ou encore *Halyomorpha halys* (Gariépy et al. 2014). Ce marqueur présente une certaine variabilité à l'échelle intra-spécifique avec un taux d'évolution relativement rapide de l'ordre de 2.3% par million d'années pour les insectes (Brower 1994) et une absence de recombinaison ce qui le rend intéressant en phylogéographie pour reconstruire l'histoire passée d'espèces mais aussi de mieux comprendre les phénomènes d'introduction (Mun et al. 2003; Muirhead et al. 2008).

On se propose donc d'utiliser cette approche pour étudier la propagation fulgurante d'un insecte envahissant s'attaquant au buis, arrivé en Europe en 2007, et à l'origine d'importants dégâts dans de nombreux sites patrimoniaux, chez les producteurs, les particuliers et dans les populations naturelles de buis sauvages (Van der Straten & Muus 2010; Nacambo 2012; Brua 2014).

La pyrale du buis *Cydalima perspectalis* est un lépidoptère de la famille des Crambidae et est présente naturellement en Chine, Corée et Japon. Cet insecte défoliateur fait son développement sur une quinzaine d'espèces du genre *Buxus* dont *B. microphylla*, très présent en Chine et utilisé en Asie comme plante ornementale dans les parcs et les jardins, et sur 3 autres espèces de ligneux : *Ilex purpurea*, *Euonymus japonicus* et *E. alata* (Casteels et

al. 2011). Sa répartition correspond à celle des espèces de *Buxus* qui sont présentes en Corée, au Japon et en Chine sur toute la côte Est, allant des forêts tropicales au Sud aux forêts tempérés au Nord, ainsi qu'au centre de la Chine (Kohler & Brückner 1989). Le cycle de cet insecte est rapide, nécessitant une quarantaine de jour pour passer du stade œuf à papillon. Dans sa zone d'origine, la pyrale du buis fait entre 3 à 5 générations par an et la chenille entre en diapause à l'automne pour passer l'hiver (Wan et al. 2014).

Cydalima perspectalis est signalée pour la première fois au Weil am Rhein en mai 2007, agglomération allemande proche de la Suisse et de la France. Toutefois quelques pépiniéristes de la région ont rapporté avoir eu des problèmes avec des chenilles sur des buis dès 2006 (Brua 2014). Une expansion fulgurante en Europe a suivi et elle est désormais présente dans 24 pays : Suisse, Pays Bas (2007), Slovénie, Autriche, France, Grande-Bretagne (2008), Belgique, Liechtenstein, Italie (2010), Turquie, Hongrie, République Tchèque, Roumanie (2011), Croatie (2012), Slovaquie, Danemark, Russie (2013), Espagne, Bulgarie, Serbie, Monténégro, Macédoine et Bosnie (Bella 2013 ; Pérez-Otero et al. 2015 ; Beshkov et al. 2015 ; N. Kirichenko comm. pers. ; D. Matosevic comm. pers. ; M. Dautbasic comm. pers.). En Europe, l'insecte s'attaque uniquement aux plantes du genre *Buxus* dont le buis commun endémique *B. sempervirens* qui est très apprécié en ornement notamment pour l'art topiaire. On retrouve cette espèce principalement dans les villes, et seuls quelques rapports font état de sa présence en milieu forestier (Gninenko et al. 2014 ; Bull. DSF 2015). Dans la zone d'introduction, l'insecte fait entre 2 à 3 générations par an et la diapause a lieu chez les jeunes stades larvaires en hiver (Résultats SaveBuxus).

L'importation de buis infestés en Allemagne depuis la Chine est l'hypothèse la plus fréquemment retrouvée dans la littérature pour expliquer l'arrivée de *C. perspectalis* en Europe (Casteels et al. 2011; Nacambo 2012). Cette théorie est corroborée par les données connues sur le transport de buis ornementaux entre l'Europe et la Chine. L'intérêt du buis comme plante ornementale dont *B. sempervirens*, espèce très prisée des jardiniers professionnels et amateurs, se traduit par d'importants échanges commerciaux au sein même de l'Europe, ce qui pourrait expliquer l'expansion rapide de l'espèce sur le continent (EPPO 2012; Matošević 2013).

Dans ce contexte, mon stage s'insère dans la problématique générale de l'unité de zoologie forestière de l'INRA d'Orléans qui est de chercher à comprendre les causes des invasions d'insectes, afin de mieux prédire et contrôler les nouvelles invasions, ce qui correspond à une priorité des politiques environnementales. Dans le cadre de cette étude

préliminaire sur les voies d'introduction et de dispersion de la pyrale du buis en Europe, mon objectif principal est de mettre en évidence le ou les scénarios d'invasion les plus probables.

L'absence de données génétiques sur ce ravageur, que ce soit dans la zone d'origine ou dans la zone d'introduction, nécessite (i) la mise en évidence d'une première caractérisation de la diversité génétique de l'insecte en Asie et en Europe à l'aide du marqueur mitochondrial COI. Les données obtenues vont ensuite nous permettre d'étudier (ii) la distribution spatiale de la diversité génétique dans la zone d'introduction afin d'avoir une première approche des mécanismes sous-tendant ce phénomène (reconstruction des routes d'invasion, nombre d'introductions, origines, localités cibles...).

II. Matériels et méthodes.

1) Echantillonnage de *Cydalima perspectalis*.

Zone d'origine : Les échantillons utilisés dans cette étude proviennent de Chine et de Corée du Sud. Le Japon n'a pu être échantillonné. Les insectes ont été récoltés dans 4 villes du nord de la Chine et dans la capitale coréenne par des collègues du CABI (Centre for Agricultural Bioscience International) entre 2012 et 2014 (Tableau I). Des chenilles ont été prélevées sur des plants de *Buxus microphylla* à Fuyang (province de Anhui, population n°4). L'hôte n'est pas connu pour les autres localités car les échantillons fournis étaient des papillons. Au total, 41 individus ont été extraits (5 à 12 individus par population).

Zone d'introduction : Parmi les 24 pays attaqués à l'heure actuelle par *C. perspectalis*, 12 d'entre eux ont pu être échantillonnés grâce à des collaborations déjà existantes avec des scientifiques de différents pays ou acquises durant notre étude (Figure 1). Cette partie du travail (recherche et prise de contacts, échanges de mails, relance des collaborateurs aux périodes de reprise d'activité des chenilles au printemps, à des dates variées en fonction des pays, obtention et récupération des échantillons) a représenté une part importante de mon début de stage et certaines localités ont été reçues trop tardivement pour être incluses dans notre étude. En fonction des pays, 1 à 4 localités ont été échantillonnées excepté pour la France (8 localités) où on disposait de nombreux contacts (Tableau I). Les individus collectés sont soit des adultes soit des chenilles. Les papillons ont été capturés par pièges à phéromones puis conservés sec. Les chenilles ont été ramassées à la main sur du buis commun ornemental *B. sempervirens* sauf à Solokhaul (Russie) où elles ont été récoltées en

milieu naturel sur le buis du caucase *B. colchica*. Après récolte, les chenilles ont été stockées dans l'alcool à 90% pour préserver l'ADN. Au total, 129 individus ont été extraits (1 à 8 individus par localité).

Tableau I : Détail des échantillons de *C. perspectalis* collectés dans la zone d'origine et la zone d'introduction. N° : Numéro de population, N : Nombre d'individus par population.

Pays	Etat	Populations	N°	Coordonnées Géographiques	Date collecte	N	
Corée S. Chine	Gyeonggi	Seoul	1	37°26'3.81"N ; 126°58'43.70"E	08/2012	8	
		Shandong	Jinan	2	36°38'27.61"N ; 117° 7'12.48"E	04/2012	5
	Anhui Zhejiang	Taian	3	36°11'18.47"N ; 117° 5'14.88"E	05/2012	8	
		Fuyang	4	32°53'24.45"N ; 115°48'51.14"E	09/2014	12	
		Hangzhou	5	30°15'35.19"N ; 120° 9'15.94"E	05/2012	8	
Allemagne	Hesse	Lorsch	6	49°38'58.41"N ; 8°33'54.22"E	2009	5	
Autriche	Vienne	Vienne	7	48°14'6.92"N ; 16°20'1.17"E	04/2015	3	
Bulgarie	Dobrič	Balchik	8	43°25'35.08"N ; 28° 9'42.68"E	2014	2	
Croatie	Zagreb	Zagreb	9	45°49'13.10"N ; 15°59'25.00"E	08/2014	5	
	Varaždin	Vinica	10	46°19'39.60"N ; 16° 9'2.40"E	07/2014	6	
Italie	Primorje-Gorski Kotar	Osor	12	44°41'36.30"N ; 14°21'32.72"E	10/2014	1	
		Gênes	Ruta Camogli	13	44°20'39.00"N ; 9°10'10.00"E	09/2014	3
	Bologne	Bologne	14	44°29'27.76"N ; 11°20'22.75"E	10/2014	3	
	Padoue	Legnaro	15	45°20'45.52"N ; 11°57'40.96"E	10/2014	4	
	Veron	Tregnago	16	45°31'13.84"N ; 11° 9'44.68"E	09/2014	4	
	France	Corse (2A)	Bastia	17	42°40'30.36"N ; 9°26'29.28"E	04/2015	3
		Charente Maritime (17)	La Rochelle	18	46° 9'37.18"N ; 1° 9'4.10"O	12/2014	4
		Gironde (33)	Bordeaux	19	44°46'1.79"N ; 0°41'41.11"O	04/2015	4
		Indre et Loire (37)	Tours	20	47°22'59.05"N ; 0°41'47.83"E	02 - 04/2015	5
	Hongrie	Isère (38)	Grenoble	21	45° 6'49.87"N ; 5°43'41.85"E	10/2014	3
Loiret (45)		Orléans	22	47°53'25.77"N ; 1°53'46.13"E	08 - 10/2014	5	
Paris(75)		Paris	23	48°50'32.60"N ; 2°20'12.80"E	09 - 11/2014	5	
Vaucluse (84)		Lagnes	24	43°53'5.78"N ; 5° 6'3.66"E	09 - 10/2014	8	
Vas		Köszeg	25	47°23'1.54"N ; 16°32'22.97"E	10/2014	4	
Csongrád		Hodmezovasarhely	26	46°25'58.67"N ; 20°20'18.23"E	10/2014	5	
Russie	Pest	Budaörs	27	47°27'55.44"N ; 18°57'41.48"E	02/2015	5	
	Baranya	Harkany	28	45°52'41.40"N ; 18°13'7.00"E	02/2015	4	
	Kraï de Krasnodar	Solokhaul	29	43°48'14.73"N ; 39°40'55.96"E	12/2014	4	
		Krasnodar	30	45° 1'44.49"N ; 38°57'58.49"E	08/2014	5	
Serbie Slovénie	Serbie Centrale	Komsomolsk	31	44°56'55.19"N ; 37°18'7.29"E	02/2014	1	
		Belgrade	32	44°47'18.40"N ; 20°27'38.20"E	07/2014	5	
	Primorska	Nova Gorica	33	45°57'28.80"N ; 13°39'13.85"E	04/2015	3	
Suisse	Bâle Campagne Tessin	Secoveljske Soline	34	45°27'53.50"N ; 13°36'45.24"E	06/2013	2	
		Liestal	35	47°28'53.78"N ; 7°44'22.46"E	05 - 09/2014	6	
Turquie		Monteggio	36	45°59'35.32"N ; 8°47'58.84"E	09/2012	3	
		Istanbul	37	41° 0'40.66"N ; 28°59'0.07"E	11/2014	5	

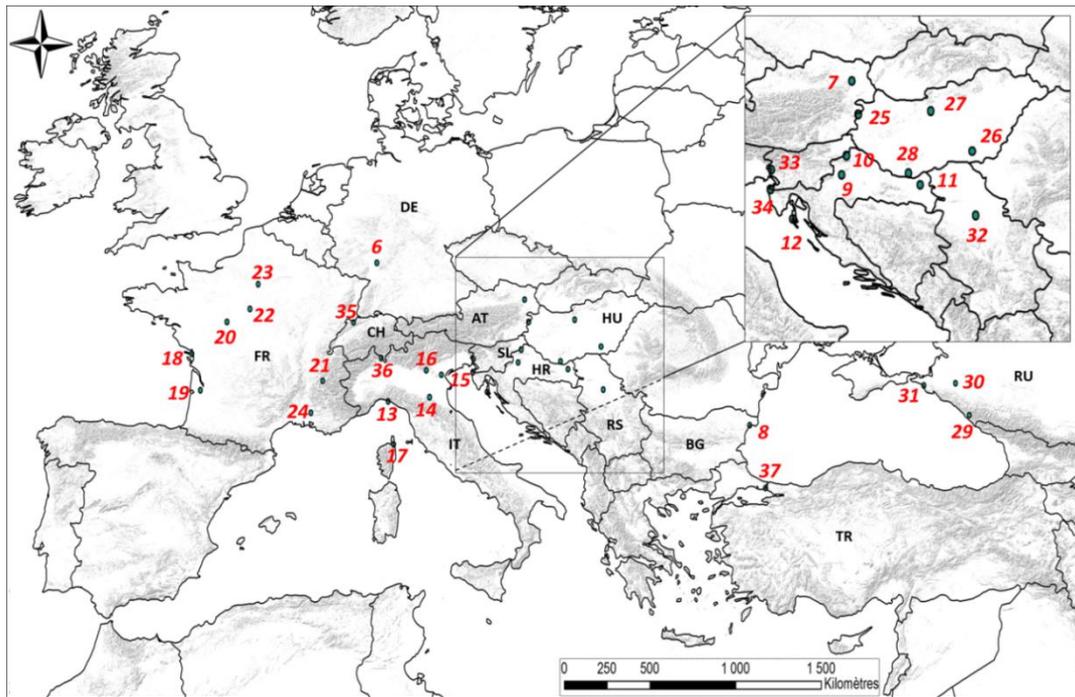


Figure 1 : Carte d'échantillonnage de *C. perspectalis* dans la zone d'introduction. Un numéro correspond à une population (cf Tableau I). FR : France; DE : Allemagne; CH : Suisse; IT : Italie; AT : Autriche; SL :Slovénie; HR : Croatie; HU : Hongrie; RS : Serbie; BG : Bulgarie; TR : Turquie; RU: Russie.

2) Analyses moléculaires.

L'ADN de chaque individu a été extrait à partir d'une patte chez les adultes. Pour les chenilles, l'organe prélevé a été choisi en fonction de la taille : l'insecte entier ou une partie du tube digestif a été utilisé. L'ADN a été extrait avec le kit NucleoSpin® Tissue XS. Nous avons amplifié un fragment d'ADN mitochondrial correspondant à une partie des gènes de la cytochrome oxydase I et II. Pour cela, nous avons utilisé un couple d'amorce déjà existant dans la littérature, dessinées par Zhu et al. (2013) pour une espèce appartenant à la même famille que la pyrale du buis, *Diaphania pyloalis* (Lepidoptera : Crambidae) : LeCyd-F2 5' TGGAGCAGGAACAGGATGAAC 3' et Cynna-R2 5' GAGACCANTACTTGCTTTCAG 3'. Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25µL (15.8µL H₂O, 2.5µL de Dream Taq Green Buffer 10x, 2.5µL de dNTP à 10mM, 0.5 µL de MgCl₂ à 2.5mM, 1µL de chaque amorce à 10µM, 0.5µL de Bétaine (5 M) et 0.2µL de Dream Taq® à 5 U/µL). Le programme utilisé était de 5 minutes à 95°C suivi de 25 cycles d'amplification (dénaturation : 35s. à 94°C, hybridation : 45s. à 60°C, élongation : 3min. à 72°C). Le résultat de chaque PCR a été révélé dans une solution de BET après migration sur un gel d'agarose à 1.5%. Les produits de PCR d'environ 1800pb ont été purifiés avec le kit NucleoFast® 96 PCR Plate et remis en suspension dans 25µL d'eau ultra pure. Chaque purification a été quantifiée à l'aide

d'un NanoDrop® 1000 pour déterminer le volume nécessaire pour la réaction de séquence de sorte à avoir 80ng d'ADN pour un volume total de 20µL. Le fragment PCR étant trop long pour être séquencé d'un seul tenant, le séquençage a été réalisé avec le kit de séquençage Big Dye® Terminator v3.1 en utilisant l'amorce Cynna (3,3µM) et l'amorce interne Jerry (5' CAACATTTATTTTGATTTTTTGG 3') communément utilisée pour les Lépidoptères. Les séquences ont été précipitées à l'alcool puis analysées avec un Séquenceur ABI 3500 (Applied Biosystem®). Elles ont ensuite été corrigées à la main avec le logiciel CodonCode Aligner v3.7.1.

3) Analyses des données génétiques.

Les séquences ont été alignées avec le logiciel Clustal W (Thompson et al. 1994) implanté dans le logiciel BioEdit v.7.1. Le caractère codant de la séquence a été vérifié avec le logiciel MEGA v.6. (Kumar et al. 2008). Un réseau d'haplotype a été construit à l'aide du logiciel TCS (Clement et al. 2000). La séquence de chaque haplotype a ensuite été comparée avec celles présentes sur GenBank pour rechercher des séquences similaires et contrôler l'identification des échantillons utilisés dans cette étude.

Les distances génétiques intra et interspécifiques ont été calculées avec le logiciel MEGA 6, en utilisant le modèle sélectionné par le logiciel (Tamura à 3 paramètres avec un gamma de 200), qui prend en compte le contenu de G/C au sein de la séquence et le biais entre les événements de substitutions de type transition et transversion. Au niveau interspécifique, on a calculé la distance génétique entre l'espèce proche *Diaphania pyloalis* (Accession number : KM576860.1) et les haplotypes de *C. perspectalis*. Au niveau intra-spécifique, on a calculé les distances entre tous les haplotypes de *C. perspectalis* et entre ceux présents dans la zone d'introduction par rapport à ceux de la zone d'origine.

Les diversités haplotypique H et nucléotidique Pi ont été calculées avec le logiciel DNAsp v.5. (Librado & Rozas 2009) pour chaque population de la zone d'origine et de la zone d'introduction. Les cartes de répartition géographique des haplotypes ont été réalisées grâce aux logiciels ArcGis v.10.2 pour le fond de carte et GenAlEx 6.4 pour la représentation graphique de la proportion des haplotypes présents dans les différentes populations étudiées.

La structuration des populations dans la zone d'origine a été analysée à l'aide des indices de diversité génétique Nst et Gst calculés avec le logiciel Permut (Pons & Petit 1996) et le niveau de significativité a été déterminé par la réplique de 1000 permutations au hasard. Le Gst prend en compte la fréquence des haplotypes par population alors que le Nst

tient également compte des divergences entre haplotypes. On observe une structuration quand $N_{st} > G_{st}$, c'est-à-dire lorsque on retrouve les haplotypes les plus fortement apparentés au sein d'une même population, ce qui signifie que les différentes populations divergent. Ces indices ont été calculés pour la zone d'origine (Chine et Corée) et pour la Chine uniquement. Malgré l'obtention d'une seule population en Corée, nous avons tenté de comparer les populations chinoises et coréennes afin de déterminer si elles sont génétiquement différentes grâce à une AMOVA (Analyses MOléculaire de VAriance) réalisée avec le logiciel Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer 2010) en tenant compte du nombre d'haplotypes par population et de leur divergence (Pairwise differentiation). Ces analyses permettent d'estimer le degré de différences génétique entre les groupes ou les populations préalablement identifiés. La présence de structure entre la zone d'origine et d'introduction a également été testée avec une AMOVA en séparant l'Asie des autres pays échantillonnés.

Au sein de la zone d'introduction, on a regardé si la diversité génétique était répartie de manière homogène sur toute la zone ou géographiquement structurée. Pour cela, une AMOVA a été réalisée en séparant de façon arbitraire les populations européennes en trois groupes en fonction de données géographiques et administratives : Europe de l'Ouest comprenant l'Allemagne, la France, l'Italie et la Suisse ; Europe Centrale comprenant la Slovénie, la Croatie, la Hongrie, l'Autriche et la Serbie ; et les pays entourant la Mer Noire : la Bulgarie, la Turquie et la Russie. On a choisi ce regroupement en supposant que l'insecte a pu se disperser de manière naturelle et que la proximité géographique a pu faciliter les échanges commerciaux. Ils ont également été regroupés de manière administrative car l'Europe de l'Ouest peut être définie comme les pays les plus producteurs de plantes ornementales, les pays de l'Europe centrale peuvent être définis comme importateurs de plants d'ornements depuis l'Europe de l'Ouest uniquement. Et les pays entourant la Mer Noire peuvent être considérés en limite de l'Europe et éloignés les uns des autres ne permettant pas une dispersion naturelle de l'insecte entre ces pays.

III. Résultats.

Généralités :

Au total, parmi les 37 localités échantillonnées (5 dans la zone d'origine et 32 dans la zone d'introduction), 170 individus ont été séquencés. Le fragment obtenu est codant et de 1428pb. Certains individus n'ont jamais amplifié, probablement en raison d'une mauvaise

conservation lors de la collecte et de l'envoi. C'est le cas de certaines populations d'Autriche, de Slovénie ou de Russie.

La distance génétique calculée entre nos séquences et l'espèce proche *D. pyloalis* (Accession number : KM576860.1) est de 7%.

Nous avons obtenu 7 haplotypes sur tout le jeu de données. La comparaison de ces haplotypes avec la seule séquence de *C. perspectalis* déjà présente sur GenBank (Accession number : AB751247.1) montre une très forte similarité de 99%. Le réseau d'haplotype montre la présence de 3 haplogroupes distincts : l'haplogroupe 1 comprenant les haplotypes HT1, HT2 et HT3, l'haplogroupe 2 comprenant HT4, HT5 et HT6 et l'haplogroupe 3 constitué uniquement de l'haplotype HT7 (Figure 2). La distance génétique moyenne séparant l'haplogroupe 2 des autres est de 0,6% et de 0,7% entre l'haplogroupe 1 et l'haplogroupe 3.

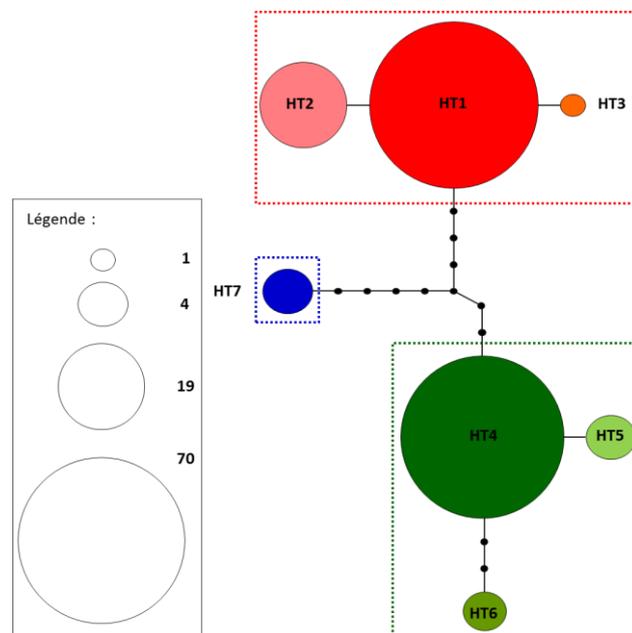


Figure 2 : Réseau d'haplotypes COI de *Cydalima perspectalis*. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. Les ronds noirs correspondent à des haplotypes manquants, chaque ligne représente une mutation.

1) Diversité génétique dans la zone d'origine de *C. perspectalis*.

On a retrouvé la totalité des haplotypes (7) parmi les 41 individus séquencés dans la zone d'origine (Tableau II). Deux haplotypes sont majoritaires, le HT1 et le HT4.

Répartition géographique des haplotypes :

En Corée, 2 haplotypes dont un privé (présent dans une seule population) ont été retrouvés à Séoul (pop. n°1) : le HT4 et le HT6 (Figure 3).

En Chine, 6 haplotypes ont été retrouvés parmi les 4 populations échantillonnées. Le HT1 et le HT4 sont présents dans toutes les populations. Le HT5 est observé dans 3 localités (sauf à Jinan, n°2, pourtant proche de Taian, n°3). Ces 2 populations possèdent des haplotypes privés, HT2 à Taian et HT3 à Jinan. Le HT7 est aussi un haplotype privé, identifié chez 4 individus à Fuyang (n°4). On n'a retrouvé que des haplotypes partagés à Hangzhou (n°5).

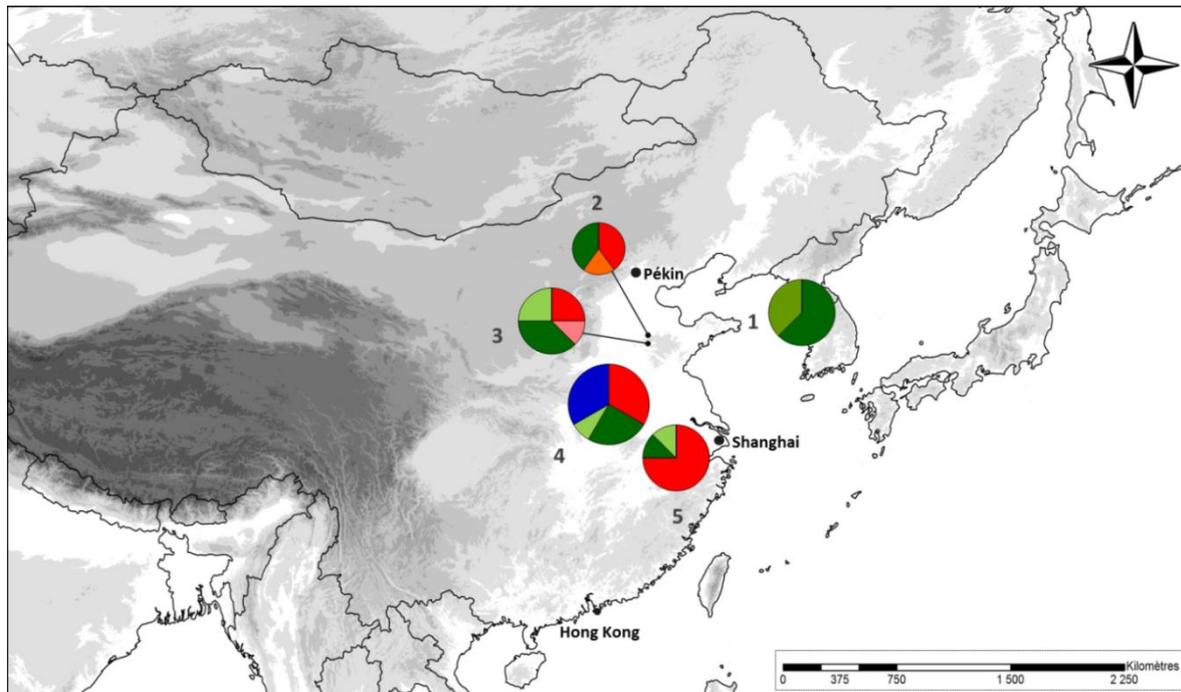


Figure 3 : Carte de répartition des haplotypes de *C. perspectalis* en Chine et Corée du Sud. (taille des cercles proportionnelle au nombre d'individus). 1 : Séoul, 2 : Jinan, 3 : Taian, 4 : Fuyang, 5 : Hangzhou.

Indices de diversité :

La diversité haplotypique est de 0,54 à Séoul et la diversité nucléotidique P_i est de 0,0008. Les populations chinoises présentent une diversité haplotypique variable allant de 0,46 pour Hangzhou à 0,82 pour Taian (Tableau II). Elles présentent une diversité nucléotidique plus élevée que la population de Séoul allant de 0,0023 (n°5) à 0,0042 (n°4).

Tableau II : Répartition des haplotypes dans la zone d'origine. N° : Numéro de population N: Nombre d'individus séquencés, H : Diversité haplotypique (\pm Erreur Standard SD), P_i : diversité nucléotidique (\pm SD).

Pays	Populations	N°	N	Haplotypes	H	P_i
Corée S.	Seoul	1	8	HT4 (5) ; HT6 (3)	0,54 (\pm 0,12)	0,0008 (\pm 0,0002)
Chine	Jinan	2	5	HT1 (2) ; HT3 (1) ; HT4 (2)	0,80 (\pm 0,16)	0,0032 (\pm 0,0009)
	Taian	3	8	HT1 (2) ; HT2 (1) ; HT4 (3) ; HT5 (2)	0,82 (\pm 0,10)	0,0031 (\pm 0,0006)
	Fuyang	4	12	HT1 (4) ; HT4 (3) ; HT5 (1) ; HT7 (4)	0,77 (\pm 0,07)	0,0042 (\pm 0,0004)
	Hangzhou	5	8	HT1 (6) ; HT4 (1) ; HT5 (1)	0,46 (\pm 0,20)	0,0023 (\pm 0,0009)
Total			41		0,76 (\pm 0,04)	0,0035 (\pm 0,0003)

Structuration des populations :

Quand on compare les indices de diversité obtenus en Asie, le G_{st} de 0,118 est inférieur au N_{st} (0,218), ce qui va dans le sens d'une structuration des populations, mais la valeur de G_{st} n'est pas significativement plus petite que celle du N_{st} ($p.value = 0,174$). De même, si on s'intéresse uniquement aux populations chinoises, le G_{st} est de 0,026 et le N_{st} de 0,077, mais ils ne sont significativement pas différents ($p.value = 0,079$).

Les résultats de l'AMOVA, dans laquelle on a comparé les populations de Chine et la population de Corée du Sud, montrent que la structure est significativement expliquée à 64% par la variation génétique intra population. La variation génétique entre groupe explique quant à elle 29 % de la structure (Tableau III) avec une valeur d'indice de différenciation F forte mais non significative.

Tableau III : Résultats de l'AMOVA à 2 groupes (Chine et Corée) au niveau de la zone d'origine. *** $P < 0.001$, d.f.: degré de liberté. Indice de différenciation F , Méthode de calcul : Pairwise differentiation.

Source de variation	Variance	% de variation	Indice F
Entre groupes	0,928	29,57	$F_{CT} = 0,296$
Entre populations au sein des groupes	0,191	6,08	$F_{SC} = 0,086$
Au sein des populations	2,021	64,35	$F_{ST} = 0,356$ ***
Total	3,140		

2) Diversité génétique dans la zone d'introduction.

Répartition géographique des haplotypes et indices de diversité :

Parmi les 129 individus séquencés dans toute la zone d'introduction, 4 haplotypes ont été identifiés et correspondent tous à des haplotypes trouvés en Asie. On retrouve majoritairement les haplotypes HT1 et HT4, le HT2 est retrouvé dans 10 populations européennes (sur 32) et le HT5 a été retrouvé chez un seul individu à Lagnes dans le sud-est de la France (n°24) (Tableau IV, Figure 4).

Quand on s'intéresse à la diversité observée pays par pays, on constate que :

Les pays présentant le plus d'haplotypes sont la **France** où l'effort d'échantillonnage a été le plus fort (37 individus) et l'**Italie** (Tableau IV). En France, 3 haplotypes ont été identifiés au sein de la population de Lagnes avec une diversité haplotypique de 0,61 ($\pm 0,16$). Il en va de même pour l'Italie où 3 haplotypes ont été identifiés au sein d'une même population à Ruta Camogli (n°13) dans la région de Gênes (présente la plus forte diversité

haplotypique : $1 \pm 0,27$). Dans ces 2 pays, on retrouve également des populations ne présentant pas de diversité génétique. En **Suisse**, on ne retrouve pas de diversité (HT1 uniquement) (Figure 4). Alors qu'en **Allemagne**, pays frontalier de la Suisse, les haplotypes HT1 et HT4 ont été retrouvés dans la même population (n°6). En **Autriche** et en **Slovénie** l'haplotype HT4 a été trouvé. L'haplotype HT1 a aussi été identifié dans la population de Nova Gorica (n°33) en Slovénie. Ces 2 haplotypes (HT1 et HT4) sont présents dans les différents pays attaqués des Balkans (Hongrie, Croatie et Serbie), proches de l'Autriche et la Slovénie. Dans cette région, l'haplotype HT4 est retrouvé dans toutes les localités alors que l'haplotype HT2 a été retrouvé dans une population (n°10). A l'inverse, c'est le seul haplotype présent en **Bulgarie** chez les quelques individus obtenus à Balchik (n°8), ville située au bord de la Mer Noire. Cet haplotype est aussi présent dans 2 populations de la Région du Caucase en **Russie**, située de l'autre côté de la Mer Noire. Les 3 localités obtenues dans le Caucase présentent majoritairement le HT1. Cet haplotype est retrouvé en **Turquie** à Istanbul (n°37) avec le HT1.

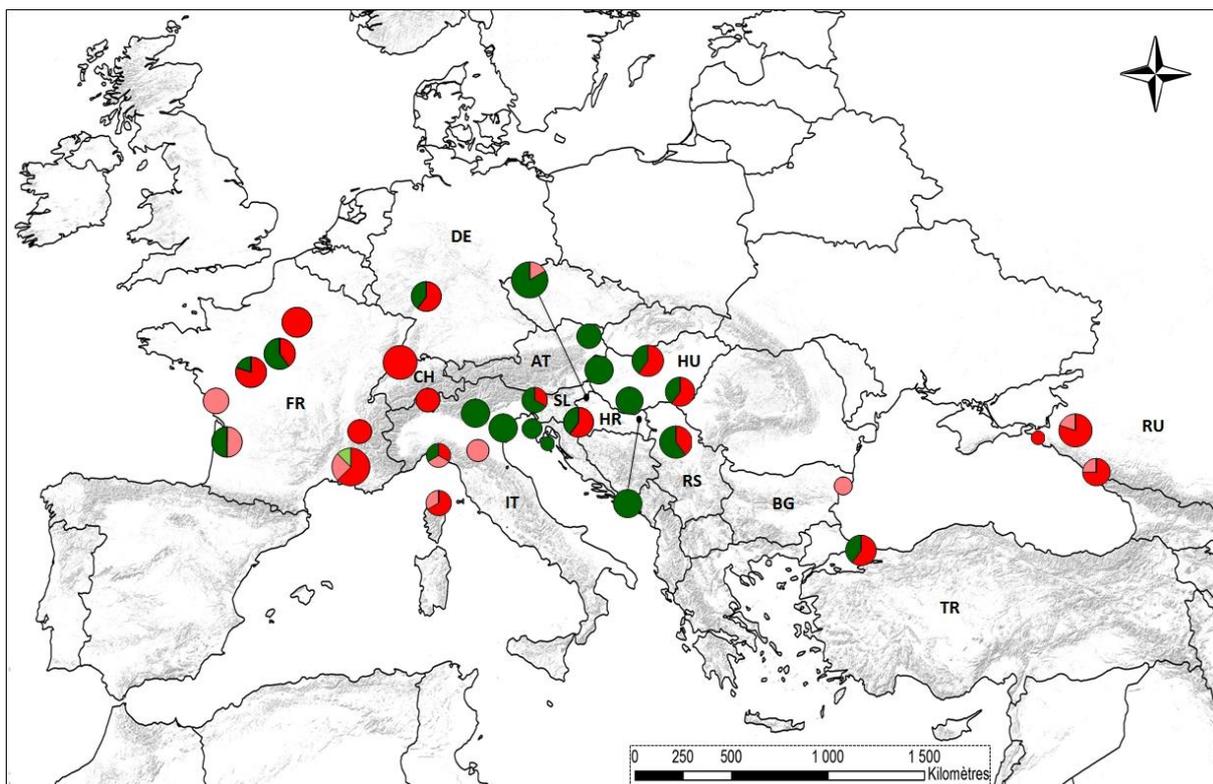


Figure 4 : Carte de répartition des haplotypes de *C. perspectalis* en Europe. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. FR : France; DE : Allemagne; CH : Suisse; IT : Italie; AT : Autriche; SL :Slovénie; HR : Croatie; HU : Hongrie; RS : Serbie; BG : Bulgarie; TR : Turquie; RU: Russie.

Tableau IV : Répartition des haplotypes dans les populations de la zone d'introduction. N° : Numéro de population, N: Nombre d'individus séquencés, H : Diversité haplotypique (\pm Erreur Standard SD), Pi : diversité nucléotidique (\pm SD).

Pays	Populations	N°	N	Haplotypes	H	Pi
Allemagne	Lorsch	6	5	HT1 (3) ; HT4 (2)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
Autriche	Vienne	7	3	HT4 (3)	0	0
Bulgarie	Balchik	8	2	HT2 (2)	0	0
Croatie	Zagreb	9	5	HT1 (3) ; HT4 (2)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
	Vinica	10	6	HT4 (5) ; HT2 (1)	0,33 (\pm 0,22)	0,0019 (\pm 0,0012)
	Visnjevaca	11	4	HT4 (4)	0	0
	Osor	12	1	HT4 (1)	-	-
Italie	Ruta Camogli	13	3	HT1 (1) ; HT2 (1) ; HT4 (1)	1 (\pm 0,27)	0,0037 (\pm 0,0016)
	Bologne	14	3	HT2 (3)	0	0
	Legnaro	15	4	HT4 (4)	0	0
France	Tregnago	16	4	HT4 (4)	0	0
	Bastia	17	3	HT1 (2) ; HT2 (1)	0,67 (\pm 0,31)	0,0005 (\pm 0,0002)
	La Rochelle	18	4	HT2 (4)	0	0
	Bordeaux	19	4	HT2 (2) ; HT4 (2)	0,67 (\pm 0,20)	0,0037 (\pm 0,0011)
	Tours	20	5	HT1 (4) ; HT4 (1)	0,40 (\pm 0,24)	0,0020 (\pm 0,0012)
	Grenoble	21	3	HT1 (3)	0	0
	Orléans	22	5	HT1 (2) ; HT4 (3)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
	Paris	23	5	HT1 (5)	0	0
Hongrie	Lagnes	24	8	HT1 (5) ; HT2 (2) ; HT5 (1)	0,61 (\pm 0,16)	0,0017 (\pm 0,0010)
	Közseg	25	4	HT4 (4)	0	0
	Hodmezovasarhely	26	5	HT1 (3) ; HT4 (2)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
	Budaörs	27	5	HT1 (3) ; HT4 (2)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
	Harkany	28	4	HT4 (4)	0	0
Russie	Solokhaul	29	4	HT1 (3) ; HT2 (1)	0,50 (\pm 0,27)	0,0004 (\pm 0,0002)
	Krasnodar	30	5	HT1 (4) ; HT2 (1)	0,40 (\pm 0,24)	0,0003 (\pm 0,0002)
	Komsomolsk	31	1	HT1 (1)	-	-
Serbie	Belgrade	32	5	HT1 (2) ; HT4 (3)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
Slovénie	Nova Gorica	33	3	HT1 (1) ; HT4 (2)	0,67 (\pm 0,31)	0,0033 (\pm 0,0015)
	Secoveljske Soline	34	2	HT4 (2)	0	0
Suisse	Liestal	35	6	HT1 (6)	0	0
	Monteggio	36	3	HT1 (3)	0	0
Turquie	Istanbul	37	5	HT1 (3) ; HT4 (2)	0,60 (\pm 0,18)	0,0029 (\pm 0,0009)
Total			1		0,62 (\pm 0,02)	0,0026 (\pm 0,0001)
			2			
			9			

Structuration des populations :

L'AMOVA a été réalisée en séparant la zone d'introduction en trois groupes : Europe de l'Ouest, Europe Centrale et les pays entourant la Mer Noire. L'analyse montre que la variation génétique intrapopulation explique de manière significative 63% de la structure. La variation génétique entre les groupes est de 26% de la structure et celle au sein des groupes de

10%. Les différents indices de différenciation génétique sont significatifs quel que soit le niveau hiérarchique choisit (populations, au sein des groupes ou entre groupes) ce qui montre l'existence de groupes génétiquement différenciés dans la zone d'introduction.

Tableau V : Résultats de l'AMOVA à 3 groupes au niveau de la zone d'introduction. * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$, d.f. : degré de liberté. Indice de différenciation F. Méthode de calcul : Pairwise differentiation.

Source de variation	Variance	% de variation	Indice F
Entre groupes	0,558	26,59	FCT = 0,266 *
Entre populations au sein des groupes	0,214	10,19	FSC = 0,139 **
Au sein des populations	1,327	63,22	FST = 0,368 ***
Total	2,099		

3) Zone d'origine versus zone d'introduction.

Parmi les 170 individus séquencés dans cette étude, les haplotypes HT1, HT2, HT4 et HT5 ont été retrouvés aussi bien dans la zone d'origine que dans celle d'introduction. Les haplotypes HT3, HT6 et HT7 sont présents uniquement en Asie.

La diversité haplotypique retrouvée globalement dans la zone d'origine est de 0,76, alors que celle retrouvée dans la zone d'introduction est moins élevée avec une valeur de 0,62. De même, la diversité nucléotidique globale est de 0,0035 en Asie alors qu'elle est de 0,0026 en Europe (Tableaux II et IV).

La distance génétique entre la Chine et la zone d'introduction est de 0,3% alors qu'elle est un peu plus élevée entre l'Europe et la Corée du Sud (0,4%). L'AMOVA entre la zone d'origine et la zone d'introduction (résultats non présentés) montre que les 2 groupes ne sont significativement pas différenciés. La variabilité génétique est expliquée par la variance intra population à 31% et inter population à 76% (p.value = 0.000).

IV. Discussion

Notre travail représente la première analyse de la structuration génétique des populations d'un ravageur nouvellement arrivé en Europe. Bien que préliminaire, et sur un nombre relativement faible de populations, cette étude a authentifié l'origine asiatique de l'insecte, et tend à confirmer l'existence vraisemblable d'introductions multiples en provenance directe des zones d'origines mais également à partir des premières populations pionnières (Van der Straten & Muus 2010; Nacambo 2012).

1) Diversité génétique de *Cydalima perspectalis*.

La comparaison des haplotypes obtenus durant notre étude avec la séquence déposée sur GenBank (Accession number : AB751247.1) montre que les individus séquencés en Europe et en Asie appartiennent bien à la même espèce. Cette séquence correspond à un individu collecté au Japon et possède cependant un autre haplotype assez différent de ceux que nous avons mis en évidence, montrant que nous n'avons pas encore exploré toute la diversité génétique présente dans la zone d'origine.

Nos haplotypes sont répartis dans 3 haplogroupes séparés d'au moins 7 pas mutationnels. Néanmoins, la distance génétique entre ces haplogroupes est inférieure à 1%, ce qui correspond bien à un niveau intra-spécifique. De plus, les distances génétiques obtenues sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées au sein des populations d'une autre espèce de la même famille de Lépidoptères (Crambidae) en Chine (Meng et al. 2008).

Nous avons mis en évidence un nombre assez faible d'haplotypes dans la zone d'origine, contrairement à ce qui peut être observé chez d'autres Lépidoptères en Chine (Niu et al. 2014 ; Wahlberg & Saccheri 2007). Cependant, ce nombre est en accord avec la faible diversité observée chez *Chilo suppressalis*, autre espèce de Crambidae présente également dans toute la Chine (Meng et al. 2008). De plus, des haplotypes privés ont été trouvés dans 4 localités sur 5 témoignant de l'existence d'une différenciation importante des populations de pyrale. La variabilité génétique et la divergence entre les haplotypes au sein de l'Asie sous-entendent une histoire évolutive complexe et un lien important avec l'Homme.

2) Caractéristique des populations de la zone d'origine.

Structuration des populations.

L'analyse du réseau d'haplotypes met en évidence la présence de trois haplogroupes divergents ce qui peut suggérer une séparation ancienne des populations de *C. perspectalis*. La reconstruction de l'évolution des grandes biomes en Chine a montré que les forêts tropicales et tempérées dans lesquelles les espèces du genre *Buxus* sont présentes, se trouvaient majoritairement au sud de la Chine durant les dernières glaciations et auraient remonté durant l'Holocène vers le nord (Ni et al. 2010). Cependant, il est probable que des populations de buis aient survécu dans différents refuges glaciaires (Qiu et al. 2011), et on peut supposer que la pyrale du buis aura suivi ses hôtes dans les refuges, séparant les populations en différents groupes.

Le faible nombre de pas mutationnels entre les haplotypes se répartissant autour d'un haplotype majoritaire au sein des haplogroupes 1 et 2 (HT1 pour l'haplogroupe 1 et HT4 pour l'haplogroupe 2) suggère quant à lui une divergence récente des haplotypes due à des diversifications postérieures au dernier maximum glaciaire, sans qu'on puisse encore parler de structure en étoile (caractéristique de populations en expansion) étant donné le faible nombre d'haplotypes trouvés dans notre étude. Les deux haplotypes privés appartenant à l'haplogroupe 1 ont été retrouvés dans les deux localités les plus au nord de la Chine. Dans le troisième haplogroupe, on retrouve HT7, présent uniquement à Fuyang chez un tiers des individus échantillonnés, ce qui est caractéristique d'une divergence importante entre cette population et les autres. De même, la présence d'haplotypes privés dans trois des quatre populations chinoises et dans la population coréenne est plutôt en faveur d'une structuration de la zone d'origine, même si elle reste faible compte tenu de nos données. L'analyse moléculaire de variance va également dans ce sens avec un indice de différenciation entre les groupes assez élevé malgré l'absence de significativité.

La cooccurrence d'haplotypes divergents dans les populations peut être due à une histoire plus récente avec une remise en contact des différents groupes soit de manière naturelle (redéploiement des espèces après les glaciations) soit par l'Homme (transports accidentels). Cela expliquerait l'absence de structure mise en évidence par les résultats d'AMOVA et la comparaison des indices de Nst/Gst . Néanmoins il est important de rappeler que les analyses ont été faites sur une seule population coréenne et que seul le nord-est de la Chine a été prospecté, alors que l'insecte est aussi présent au Japon et dans le sud de la Chine (Wan et al. 2014). L'ajout de nouvelles populations collectées dans le sud de la Chine en particulier, où l'on trouve de nombreuses buxaias naturelles (M. Kenis, comm. pers.) et au Japon pourraient nous aider à mieux comprendre l'histoire évolutive de cette espèce.

Un passage du milieu forestier à urbain.

Les échantillons de la zone d'origine ont tous été collectés en ville, à proximité de jardins et dans des plantations ornementales (pour Fuyang). Aujourd'hui, on sait qu'une espèce qui est liée aux activités humaines a plus de chance d'être transportée par l'Homme (Su 2013). De plus, on a constaté depuis quelques années que différents insectes forestiers ont la particularité d'être passé du compartiment forestier de leur zone d'origine à l'espace urbain et sub-urbain dans leurs zones d'introductions. C'est notamment le cas de la processionnaire du pin *Thaumetopoea pityocampa* (Robinet et al. 2012) qui progresse en latitude sous l'effet du changement climatique en attaquant les pins présents dans les villes, de la mineuse du

marronnier *Cameraria ohridella* (Valade et al. 2009) originaire des peuplements sauvages de marronniers des Balkans, qui a profité du développement d'infrastructures routières pour rapidement coloniser tous les marronniers ornementaux d'Europe, et c'est donc également le cas de la pyrale du buis, qui est à l'origine une espèce présente dans les forêts naturelles de buis en Asie, mais qui a été importée dans les villes chinoises à la faveur d'aménagements d'espaces verts et de jardins privés (M. Kenis comm. pers.). L'existence de premiers goulots d'étranglement en Chine reflétant de fortes réductions de la taille de populations (et donc de la diversité génétique associée) correspondrait alors au passage de certains individus du milieu forestier à urbain comme cela a été mis en évidence pour *Cameraria ohridella* dans les Balkans, où les populations endémiques collectées dans des villes grecques ont montré une diversité génétique beaucoup plus faible que dans les forêts naturelles avoisinantes (Lees et al. 2011).

Dans le cas de la pyrale, la présence simultanée de différents haplotypes phylogénétiquement éloignés (appartenant respectivement aux trois haplogroupes distincts) dans les différentes villes échantillonnées peut s'expliquer par une dispersion passive de l'insecte dans laquelle l'Homme a joué un rôle déterminant. Sa dispersion peut effectivement être grandement facilitée par son hôte qui est lui-même transporté par l'Homme et sa présence dans les villes signifie que l'insecte peut également se rencontrer dans les pépinières et les jardinerie, augmentant ainsi les risques de propagation à courte, moyenne ou longue distance. Ainsi, la cooccurrence des haplogroupes au sein d'une même population pourrait aussi s'expliquer par le transport de plants de buis entre les différentes villes de Chine.

3) Invasion de *Cydalima perspectalis* en Europe.

En faveur de multiple introductions.

L'utilisation de marqueurs moléculaire pour retracer l'historique d'une invasion permet de détecter d'éventuelles signatures génétiques liées à cette invasion, comme la perte de diversité due à des goulots d'étranglement (Sakai et al. 2001). On observe une réduction de la diversité génétique chez *C. perspectalis* puisque tous les haplotypes ne sont pas présents en Europe mais elle est faible. Plus de la moitié des haplotypes de *C. perspectalis* trouvés dans la zone d'origine ont été mis en évidence dans la zone d'introduction. Et si on suppose que l'insecte provient de Chine (Nacambo et al. 2014), deux-tiers de la diversité génétique en Chine est retrouvée dans la zone d'introduction. L'existence d'une forte diversité en Europe est en faveur d'introductions multiples de l'espèce, comme cela a été mis en évidence pour la

chrysomèle des racines du maïs *Diabrotica virgifera virgifera* en Europe (Ciosi et al. 2008), l'écrevisse de Louisiane *Procambarus clarkii* dans le Sud de la Californie (Quan et al. 2014) ou encore l'amphipode invasif *Caprella scaura* au niveau de la péninsule Ibérique (Cabezas et al. 2014). En outre, les résultats d'AMOVA au sein de la zone d'introduction de *C. perspectalis* vont également dans ce sens. Ils ont permis de révéler la présence d'une structuration géographique entre les trois groupes définis pour l'analyse, ce qui suggère l'existence d'événements d'introductions différents entre ces groupes, comme cela a été montré pour le lézard *Lampropholis delicata* introduit à plusieurs reprises dans différentes îles du Pacifique (Chapple et al. 2013). Il est donc possible que l'insecte ait été introduit une seule fois en Europe depuis la Chine mais massivement, avec un fort pool génétique, et ensuite redistribué dans les différents pays européens ou qu'il ait été introduit de manière répétée dans le temps et/ou dans l'espace depuis la Chine vers l'Europe.

Scénarios d'introduction possibles.

Les données génétiques actuelles ne permettent pas de déterminer le scénario le plus probable ; néanmoins, si on met en relation les informations génétiques obtenues et celles connues sur le marché ornemental, cela peut nous permettre de les affiner :

Tout d'abord, si on suppose que l'insecte a été introduit massivement mais une seule fois en Europe depuis la Chine, les pays ayant pu réceptionner cette population sont l'Allemagne qui reçoit des marchandises importés depuis ce pays (Casteels et al. 2011) et les Pays-Bas qui importent beaucoup depuis la Chine (EPPO 2012) et dont la première infestation date de 2007 dans des villes impliquées dans le transport de plants d'ornement (Van der Straten & Muus 2010). Néanmoins, des retours de pépiniéristes concernant la présence de chenilles non identifiées sur les buis en 2006 en Allemagne (Brua 2014) iraient en faveur d'une introduction massive dans ce pays. Cette population a pu alors servir de zone source pour l'introduction de la pyrale du buis dans d'autres pays européens (Cadic & Widehem 2006)

Si on suppose que l'insecte a été introduit en Europe à plusieurs reprises depuis la Chine, les pays européens autres que l'Allemagne ayant pu réceptionner de nouveaux buis infestés, sont les Pays-Bas et l'Italie car ils ont importé des buis depuis la Chine ces dix dernières années (EPPO 2012). De plus, seuls les haplotypes HT1 et HT4 ont été retrouvés en Allemagne en 2009 alors qu'en Italie, trois haplotypes ont été retrouvés durant ces analyses ce qui irait en faveur d'introductions différentes.

Dispersion de l'insecte dans la zone d'origine.

Les résultats obtenus durant cette étude nous permettent de commencer à appréhender la dispersion rapide de *C. perspectalis* dans la zone d'introduction. La répartition des haplotypes dans les pays récemment envahis (2013-2014) et les données du commerce de plantes d'ornements (arbres et arbustes) (Cadic & Widehem 2006) peuvent nous aider à dissocier la dispersion naturelle de l'insecte de la dispersion passive due à l'Homme. Il est intéressant de regarder la situation dans les pays dernièrement attaqués (Russie, Bulgarie et Serbie), où on peut supposer que les premières populations de pyrale du buis observées correspondent bien à celles qui ont été introduites sans que les populations aient encore eu le temps de se mélanger. La présence de l'insecte en Serbie semble en faveur d'une dispersion naturelle avec la mise en évidence des mêmes haplotypes retrouvés dans les pays frontaliers (Hongrie et Croatie). De plus aucune donnée sur l'importation de plantes d'ornements n'est connue pour ce pays. A l'inverse, le commerce de buis expliquerait mieux la présence de l'insecte en Bulgarie et en Russie. En effet, la Russie s'est approvisionnée en buis depuis l'Italie pour les jeux olympiques de Sotchi et aurait ainsi importé *C. perspectalis* dans cette région (Gninenko et al. 2014), ce qui est cohérent avec les haplotypes retrouvés. L'introduction de l'insecte en Bulgarie semble être aussi due à l'Homme avec la présence d'un haplotype différent de ceux mis en évidence en majorité (HT1 et HT4) dans les Balkans et la distance importante entre les lieux de première observation et les pays frontaliers déjà attaqués, mais des données historiques et l'ajout de populations de Roumanie seront nécessaires pour le justifier.

4) Conclusion et Perspectives : vers le retraçage des voies d'invasions et de populations sources.

Les distances génétiques calculées entre la Corée, la Chine et la zone d'introduction vont en faveur d'une origine chinoise de *C. perspectalis* plutôt que coréenne, tout comme l'absence en Europe de l'haplotype privé HT6 retrouvé pourtant chez un tiers des individus en Corée. En Europe également, l'absence de l'haplotype privé HT7 identifié uniquement à Fuyang chez plusieurs individus, qui n'est pas une ville de commerce (A. Roques comm. pers.), ne va pas en faveur de cette population comme source possible pour les pyrales du buis introduites en Europe. Cependant l'absence de structure dans la zone d'origine ainsi que la présence des mêmes haplotypes majoritaires en Asie qu'en Europe rend encore difficile le retraçage des voies d'invasions et des populations sources. Des études sur les routes

d'invasions utilisant uniquement le marqueur COI montrent qu'il est difficile de définir la ou les zones sources des populations introduites quand les haplotypes retrouvés dans la zone d'introduction correspondent à ceux répartis majoritairement dans la zone d'origine, cela a notamment été le cas pour le Lézard silicien *Podarcis siculus* (Kolbe et al. 2013; Gariépy et al. 2014). D'autres échantillonnages en Chine, en Corée, au Japon dans les villes, mais aussi dans les milieux forestiers seront nécessaires pour mieux décrire la diversité génétique présente dans la zone d'origine et déterminer la ou les zone(s) source(s) possible(s) des populations de *C. perspectalis* en Europe. Mais c'est surtout l'utilisation de marqueurs plus polymorphes combinés aux données mitochondriales seront nécessaires pour identifier la population(s) source(s) (Estoup & Guillemaud 2010) et confirmer de manière fiable l'origine chinoise déjà avancée dans la littérature (Casteels et al. 2011; Nacambo et al. 2014).

Concernant les voies d'invasions de l'insecte en Europe, les données actuelles ne permettent pas encore de définir la part de l'Homme dans l'expansion très véloce de l'insecte dans la zone d'introduction. L'important commerce de plantes ornementales au sein de l'Europe a pu permettre la dispersion rapide de la pyrale du buis dans la zone d'introduction mais une meilleure connaissance du commerce de buis intra-Europe sera nécessaire pour mieux comprendre le processus et les voies d'invasions. De plus l'ajout de populations clés comme les Pays-Bas (leader du commerce horticole européens), la Belgique (important producteur de plantes ornementales) (Cadic & Widehem 2006) ou encore l'Espagne, un des derniers pays envahis (Pérez-Otero et al. 2015), nous aideront à mieux comprendre non seulement les mécanismes sous-tendant les phénomènes d'introduction mais surtout la propagation fulgurante de cet invasif dans de nouveaux territoires.

Remerciements

Je tiens à remercier Alain Roques pour m'avoir accueillie au sien de son unité, Marie-Anne Auger Rozenberg pour sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité et de m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant ! Je remercie l'ensemble de l'Unité de Zoologie Forestière pour leur accueil. Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont fournies des échantillons : Carlos Lopez Vaamonde, Géraldine Roux, Julien Haran Patrick Pineau, Agathe Dupin, Caroline Gutleben, Jean-Emmanuel Michaut, Anthony Droui, Jean-Claude Martin, Estelle Morel, Cyril Kruczkowski, Mark Kenis, Christian Burban,

Liesbet Van Remmortere, Véték Gabor, Rosa Pérez Otero, Stanislav Gomboc, Gabrijel Seljak, Dinka Matosevic, Kahraman Ipekdal, Annette Herz, Valery Shurov, Ivanka Ivanova, Elina Chatzidimitriou, Christian Stauffer et Katalin Tuba.

Bibliographie :

- Auger-Rozenberg MA, Boivin T, Magnoux E, Courtin C, Roques A, Kerdelhué C** (2012) Inferences on population history of a seed chalcid wasp: Invasion success despite a severe founder effect from an unexpected source population. *Mol Ecol* **21**:6086–6103.
- Avtzis DN, Matosevic D** (2013) Taking Europe by storm: A first insight in the introduction and expansion of *Dryocosmus kuriphilus* in Central Europe by mtDNA. *ŠUMARSKI LIST* **137**:387–394.
- Bella S** (2013) The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in Southern Europe: New records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia* **96**:51–55.
- Beshkov S, Abadjiev S, Dimitrov D** (2015) *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae) – New invasive pest moth in Bulgaria. *Entomologist's Rec. J. Var* **127**:18–22.
- Brower AV** (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl Acad. Sci.* **91**:6491–6495.
- Brua C** (2014) La pyrale du buis: le point sur cette espèce envahissante. *Phytoma* 675:16–22.
- Bulletin d'information sur la santé des forêts jurassiennes**, fev. 2015, Ed : Office de l'environnement, 4p.
- Cabezas MP, Xavier R, Branco M, Santos AM, Guerra-García JM** (2014) Invasion history of *Caprella scaura* Templeton, 1836 (Amphipoda: Caprellidae) in the Iberian Peninsula: multiple introductions revealed by mitochondrial sequence data. *Biol Invasions* **16**:2221–2245.
- Cadic A, Widehem C** (2006) L'horticulture Ornementale Française. Structure, Acteurs et Marchés. Un Point Sur INRA Editions, Paris (France) 2-7380-1207-8.
- Casteels H, Witters J, Vandierendonck S, Van Remoortere L, Goossens F** (2011) First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera : Crambidae) in Belgium. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 76/2

- Chapple DG, Miller KA, Kraus F, Thompson MB** (2013) Divergent introduction histories among invasive populations of the delicate skink (*Lampropholis delicata*): Has the importance of genetic admixture in the success of biological invasions been overemphasized? *Diversity Distrib.* **19**:134–146.
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, Giordano R, Estoup A, Guillemaud T** (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Mol Ecol* **17**:3614–3627.
- Clement M, Posada D, Crandall KA** (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* **9**:1657–1659.
- Estoup A, Guillemaud T** (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: Why, How and so What? *Mol Ecol* **19**:4113–4130.
- EPPO** (2012). EPPO Technical Document No.1061, EPPO Study on the risk of imports of plants for planting. EPPO Paris. www.eppo.int/QUARANTINE/EPPO_Study_on_Plants_for_planting.pdf.
- Excoffier L, Lischer H** (2010) Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **10**:564–567.
- Gariepy TD, Haye T, Fraser H, Zhang J** (2014) Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. *J Pest Sci* **87**:17–28.
- Gninenko YI, Shiryaeva NV, Shurov VI** (2014) The box tree moth – a New Invasive Pest in the Caucasia, Forests. *Карантин растений Наука и практика* **7**:36-39.
- Kohler E, Brückner P** (1989) The genus *Buxus* (Buxaceae): Aspects of its differentiation in space and time. *Pl. Syst. Evol.* **162**:267–283.
- Kolbe J, Lavin B, Russell L, Rugiero L, Capula M, Luiselli L** (2013) The desire for variety: Italian wall lizard (*Podarcis siculus*) populations introduced to the United States via the pet trade are derived from multiple native-range sources. *Biol Invasions* **15**:775–783.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K** (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform* **9**:299–306.
- Lesieur V, Yart A, Guilbon S, Lorme P, Auger Rozenberg MA, Roques A** (2014) The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity? *Biol Invasions* **16**:1833–1849.
- Librado P, Rozas J** (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451–1452.

- Martinez M, Germain JF, Streito JC** (2014) Actualités Entomologiques : Nouveaux Insectes Ravageurs Introduits En France Métropolitaine (Période Juillet 2005 À Juin 2014). *Actes du Colloque AFPP « Ravageurs et insectes invasifs et émergents »*, Montpellier, oct. 2014.
- Matošević D** (2013) Box tree moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), new invasive insect pest in Croatia. *SEEFOR* **4**:89–94.
- Meng XF, Shi M, Chen XX** (2008) Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. *Mol Ecol* **17**:2880–2897.
- Muirhead J, Gray D, Kelly D, Ellis S, Heath D, Macisaac H** (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Mol Ecol* **17**:1020–1035.
- Mun J, Bohonak A, Roderick G** (2003) Population structure of the pumpkin fruit fly *Bactrocera depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pliocene allopatry or recent invasion? *Mol Ecol* **12**:2941–2951.
- Nacambo S** (2012) Parasitisme, développement, modèle climatique et impact de *Cydalima perspectalis* en Europe. Master 2, Université de Neuchâtel, 40p.
- Nacambo S, Leuthardt F, Wan H, et al.** (2014) Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *J. Appl. Entomol.* **138**:14–26.
- Ni J, Yu G, Harrison S, Prentice C** (2010) Palaeovegetation in China during the late Quaternary: Biome reconstructions based on a global scheme of plant functional types. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **289**:44–61.
- Niu YQ, Nansen C, Li XW, Liu TX** (2014) Geographical variation of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations revealed by mitochondrial COI gene in China. *J. Appl. Entomol.* **138**:692–700.
- Pérez-Otero R, Mansilla JP, Vidal M** (2015) *Cydalima perspectalis* Walker, 1859 (Lepidoptera, Crambidae): una nueva amenaza para *Buxus* spp. en la Península Ibérica. *AE* **10**:225–228.
- Pons O, Petit RJ** (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**:1237–1245.
- Qiu YX, Fu CX, Comes HP** (2011) Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora. *Mol Phylogenet Evol* **59**:225–244.
- Quan A, Pease K, Breinholt J, Wayne R** (2014) Origins of the invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the Santa Monica Mountains. *Aquatic Invasions* **9**:211–219.

- Résultats** **Save** **Buxus :** https://listes.univ-montp2.fr/sympa/d_read/evolfrance/divers/Biocontr%C3%B4le%20de%20la%20pyrale%20du%20buis%20Cydalima%20perspectalis.pdf
- Robinet C, Imbert CE, Rousselet J, et al.** (2012) Human-mediated long-distance jumps of the pine processionary moth in Europe. *Biol Invasions* **14**:1557–1569.
- Roques A** (2010) Alien forest insects in a warmer world and a globalised economy: impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *NZJFS* **40 suppl**:77–94.
- Roques A, Fan JT, Courtial B, et al.** (2015) Planting Sentinel European Trees in Eastern Asia as a Novel Method to Identify Potential Insect Pest Invaders. *PloS One* **10**: accessed June 2015.
- Sakai A, Allendorf F, Holt J, et al.** (2001) The Population Biology of Invasive Specie. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **32**:305–332.
- Van der Straten M, Muus T** (2010) The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proc. Neth. Soc. Meet* **21**:107–111.
- Su NY** (2013) How to Become a Successful Invader ? *Florida Entomologist* **96**:765–769.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673–4680.
- Vaes-Petignat S, Nentwig W** (2014) Environmental and economic impact of alien terrestrial arthropods in Europe. *NeoBiota* **22**:23–42.
- Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A, et al.** (2009) Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Mol Ecol* **18**:3458–3470.
- Wan H, Haye T, Kenis M, et al.** (2014) Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *J. Appl. Entomol.* **138**:14–26.
- Wahlberg N; Saccheri I** (2007) The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera : Nymphalidae). *EJE* **104**:675-68
- Zhu BJ, Liu QN, Dai LS, et al.** (2013) Characterization of the complete mitochondrial genome of *Diaphania pyloalis* (Lepidoptera: Pyralididae). *Gene* **527**:283–291.

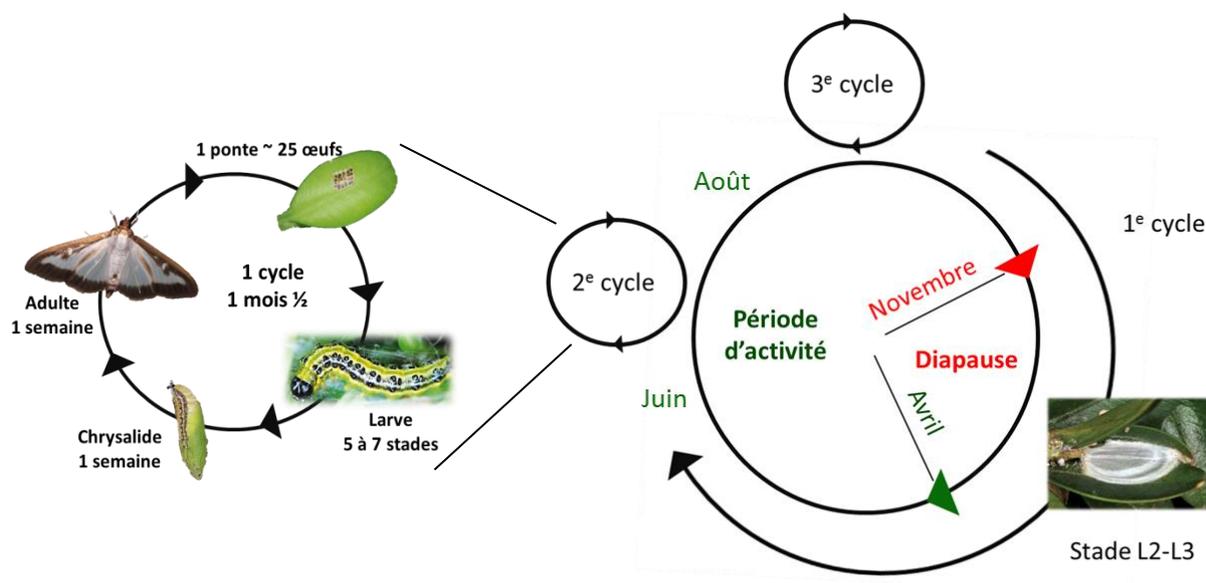
ANNEXES :

ANNEXE 1 : Cycle biologique de la pyrale du buis.

ANNEXE 2 : Photographie de dégâts occasionnés par la pyrale du buis, Parc Pasteur, Orléans, Mai 2015.

ANNEXE 3 : Réseau d'haplotypes COI de *Cydalima perspectalis* représenté avec les différents pays échantillonnés (Zones d'origine ZO et d'introduction ZI). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. L'année de première observation de l'insecte est indiqué par pays.

ANNEXE 1 : Cycle biologique de la pyrale du buis.



ANNEXE 2 : Photographie de dégâts occasionnés par la pyrale du buis, Parc Pasteur, Orléans, Mai 2015.



ANNEXE 3 : Réseau d'haplotypes COI de *Cydalima perspectalis* représenté avec les différents pays échantillonnés (Zones d'origine ZO et d'introduction ZI). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. L'année de première observation de l'insecte est indiquée par pays.

